

УДК 577.1.087 + 577.3

РАЗБАВЛЕНИЕ СРЕДЫ ИНКУБАЦИИ БЕСКИСЛОРОДНОЙ ДОБАВКОЙ КАК ВЕРОЯТНАЯ ПРИЧИНА ЭФФЕКТА БЫСТРОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

М.Б. Белякова, М.В. Миняев, А.А. Егорова, Л.И. Ворончихина

Тверской государственный университет

Моделировалось явление эффекта быстрого потребления кислорода, заключающееся в быстром снижении показаний полярографа при добавлении к среде инкубации митохондриальных препаратов даже при отсутствии субстратов окисления. Показано, что наиболее вероятной причиной данного эффекта является разбавление среды инкубации препаратом, содержание кислорода в котором существенно ниже, чем в среде.

При измерении потребления кислорода гомогенатами тканей или суспензиями митохондрий практически всегда проявляется эффект быстрого перемещения пера самописца полярографа от положения, указывающего начальную концентрацию кислорода, в сторону нуля в момент внесения тканевого препарата как в присутствии, так и в отсутствие субстратов окисления [1]. Это явление получило название эффекта быстрого потребления кислорода (ЭБПК) или эффекта введения. При больших объемах добавки величина ЭБПК может достигать 30 % и более от содержания кислорода в среде инкубации [1], в связи с чем большое значение приобретает вопрос о механизме данного явления, так как только с его помощью можно решить, учитывать или не учитывать значение ЭБПК при расчете окончательных результатов измерения потребления кислорода.

В настоящее время вопрос о механизме ЭБПК нельзя считать окончательно решенным, так как в литературе встречается несколько противоречивых точек зрения на причины его возникновения. Биохимические объяснения эффекта введения базируются на предположении, что резкое снижение концентрации кислорода при внесении препарата митохондрий или гомогената тканей в среду инкубации является следствием мгновенного усиления окисления эндогенных субстратов в митохондриях [1]. Согласно другим авторам [3-6], ЭБПК имеет физико-химические причины: внесение в среду инкубации вязкой добавки, в качестве которой рассматривается митохондриальная суспензия или тканевый гомогенат, приводит к повышению вязкости реакционной смеси в целом и, как следствие, к снижению тока в полярографической ячейке за счет увеличения толщины диффузионного слоя индикаторного электрода.

Вне зависимости от того, какой точки зрения на механизм ЭБПК придерживаются авторы перечисленных публикаций, ими отмечены некоторые важные моменты, которые позволяют дать совершенно иную трактовку результатам проведенных ими исследований:

1. ЭБПК развивается за очень короткий промежуток времени (от 4-8 с [1] до 10-60 с, что соответствует времени полного перемешивания среды инкубации с добавкой [3-6].

2. Величина ЭБПК пропорциональна объему добавки всегда [1] или при однократном введении [3-6].

3. Величина ЭБПК достоверно возрастает по мере хранения митохондрий на льду в течение опыта [1] и не исчезает после трехдневного хранения тканевого гомогената при комнатной температуре [3-6].

4. Обнаружена корреляция между величиной ЭБПК и скоростью дыхания митохондриального препарата [1;2].

5. ЭБПК не проявляется при добавлении митохондрий, предварительно проинкубированных с ингибиторами клеточного дыхания, но развивается в полной мере при добавлении ингибиторов непосредственно в среду инкубации [1].

6. ЭБПК развивается при добавлении к среде инкубации нейтральных растворов, прошедших предварительное кипячение (крахмальный гель, раствор ДНК и др.), и не прояв-

ляется, если добавка не подвергалась термообработке (взвесь крахмала, раствор белка и др.) [3-6].

Перечисленные факты можно объяснить тем, что растворы, вызывающие ЭБПК, предположительно имеют более низкую концентрацию кислорода, чем среда инкубации. Поэтому смешивание бескислородной или содержащей мало кислорода добавки с насыщенной кислородом средой инкубации должно приводить к пропорциональному объему добавки снижению концентрации кислорода в смеси, что и регистрируется полярографом как ЭБПК. Причины же снижения содержания кислорода в добавке могут быть самыми различными: кипячение, медленное эндогенное дыхание митохондрий в густой суспензии, потребление кислорода микрофлорой при длительном хранении гомогената и др. Устранение этих причин, согласно авторам приведенных публикаций, например, путем предварительной инкубации митохондрий с ингибиторами эндогенного дыхания или путем устранения этапа термической обработки добавок, всегда ведет либо к исчезновению, либо к резкому снижению величины ЭБПК.

Поэтому цель данной работы заключалась в проверке предположения, что ЭБПК развивается как результат снижения концентрации кислорода в инкубационной среде при ее разбавлении бескислородной добавкой.

В работе использовалась термостатированная при 37 °С открытая измерительная ячейка объемом 4 мл с вмонтированным в нее амперометрическим кислородным датчиком закрытого типа [3] совместно с кислородомером N5221 (пр-во ПНР) и регистратором ЭПП-09 мЗ. Чтобы исключить искажения результатов, связанные с осмотическими явлениями на мембране закрытого кислородного датчика, в качестве среды инкубации использовался раствор KCl с концентрацией 60 г/л (3,5 мл), который по составу и осмотическому давлению практически не отличался от электролита датчика. Инкубационная среда предварительно насыщалась атмосферным кислородом при температуре 37 °С. ЭБПК моделировался путем введения в среду инкубации бескислородной добавки, в качестве которой служила та же среда инкубации, кислород из которой удалялся путем непрерывной (на протяжении всего эксперимента) продувки раствора азотом, насыщенным водяным паром при 37 °С. Для восстановления исходных условий измерительная ячейка после каждого замера заполнялась свежей насыщенной кислородом средой инкубации и выдерживалась 10 мин.

Было проведено четыре серии по 10 замеров изменения парциального давления кислорода в среде инкубации в результате внесения бескислородной добавки. Серии различались объемом добавки: 100, 200, 300 и 400 мкл.

Так как внесение бескислородной добавки в насыщенную кислородом среду инкубации можно рассматривать как разбавление раствора кислорода, которым является насыщенная среда инкубации, чистым растворителем, в качестве которого выступает бескислородная добавка, ожидаемое снижение концентрации кислорода может быть легко рассчитано. Результаты предварительных расчетов представлены в табл. 1, где $V_{доб.}$ – результат предварительной калибровки микродозатора, при помощи которого вносилась добавка, P_{O_2} – парциальное давление кислорода в среде (в % от парциального давления кислорода в атмосфере) после смешивания с добавкой соответствующего объема, ΔP_{O_2} – снижение парциального давления кислорода в среде (%), ЭБПК – кажущееся снижение содержания кислорода в среде (моль·10⁻⁸).

Средние значения результатов обработки экспериментально полученных значений ЭБПК для тех же объемов бескислородной добавки представлены в табл. 2.

Таблица 1

Расчетные значения ЭБПК и падения парциального давления кислорода
в зависимости от объема бескислородной добавки

$V_{доб.}$ (мкл)	P_{O_2} (%)	ΔP_{O_2} (%)	ЭБПК (моль·10 ⁻⁸)
99,3	97,24	2,76	1,46
197,8	94,65	5,35	2,84
299,5	92,12	7,88	4,18
400,2	89,74	10,26	5,44

Таблица 2

Экспериментальные значения ЭБПК и падения парциального давления кислорода в зависимости от объема бескислородной добавки

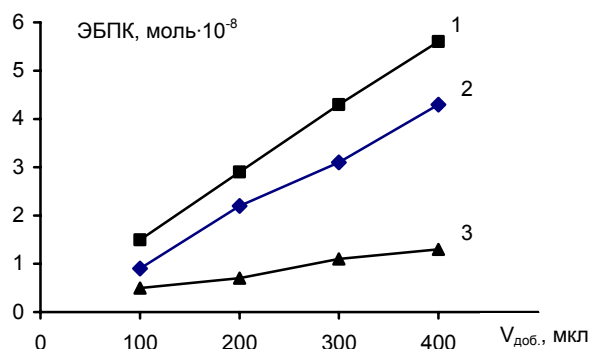
$V_{\text{доб.}}$ (мкл)	P_{O_2} (%)	ΔP_{O_2} (%)	ЭБПК (моль·10 ⁻⁸)
99,3	98,29±0,10	1,71±0,10	0,91±0,05
197,8	96,00±0,06	4,00±0,06	2,12±0,03
299,5	94,18±0,08	5,75±0,08	3,05±0,04
400,2	92,22±0,11	7,78±0,11	4,13±0,06

Для удобства сравнения расчетные и средние значения экспериментально полученных данных были сведены в табл. 3, где дополнительно показано отклонение экспериментально полученных результатов от расчетных. Представленные зависимости в графической форме отражены на рисунке.

Таблица 3

Зависимость расчетных и экспериментальных значений ЭБПК от объема бескислородной добавки

$V_{\text{доб.}}$ (мкл)	ЭБПК (моль·10 ⁻⁸)		Отклонение (моль·10 ⁻⁸)
	расч.	эксп.	
99,3	1,46	0,91	0,56
197,8	2,84	2,12	0,69
299,5	4,18	3,05	1,10
400,2	5,44	4,13	1,24



Зависимость расчетных и экспериментальных значений ЭБПК от объема бескислородной добавки:

- 1 — расчетные значения ЭБПК; 2 — экспериментальные данные;
3 — отклонение экспериментально полученных значений ЭБПК от расчетных

Как видно из рисунка, количественные характеристики ЭБПК как расчетные, так и экспериментально полученные, практически прямо пропорциональны объему добавки. Причем экспериментальные значения оказались несколько ниже расчетных. На наш взгляд, это объясняется тем, что при переносе добавки с помощью микродозатора в инкубационную среду добавка успевает поглотить некоторое количество кислорода из атмосферы. Данное предположение подтверждается тем, что с повышением объема добавки отклонение от расчетных величин заметно возрастает, что можно объяснить увеличением площади поверхности раздела атмосфера–добавка в связи с конической формой наконечника микродозатора.

Таким образом, добавление к инкубационной среде небольшого количества жидкости с пониженной концентрацией кислорода, каковой на наш взгляд является и густая суспензия митохондрий, приводит к возникновению эффекта, который по своим количественным характеристикам практически не отличается от ЭБПК, регистрируемого при внесении в среду инкубации гомогенатов тканей, клеточных и митохондриальных суспензий.

На основании вышеизложенного можно предположить, что рассмотренный в данной работе эффект разведения реакционной среды бескислородной добавкой может рассматриваться как одна из наиболее вероятных причина ЭБПК, наблюдаемого при работе с биологическими объектами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Котова Е.И., Ротенберг Ю.С. Исследование быстрого потребления O_2 митохондриями при введении их в аэробную среду инкубации // Биохимия. 1975. Т. 20, вып. 4. С. 746-747.
2. Миняев М.В. Гальванический кислородный датчик с пониженной собственной кислородной емкостью // Актуальные проблемы биохимии и биотехнологии. Тверь, 2001. С. 154-161.
3. Панченко Л.Ф., Шпаков А.А. и др. Ферментная, электронномикроскопическая и полярографическая характеристики изолированных митохондрий мозга крыс. I. Новый метод выделения // Цитология. 1973. Т. 15, вып. 12. С. 1481-1486.
4. Шпаков А.А., Панченко Л.Ф. О природе эффекта «быстрого потребления» кислорода при внесении гомогената тканей или суспензии митохондрий в полярографическую ячейку // Биофизика. 1975. Т. 20, вып. 3. С. 467-471.
5. Шпаков А.А., Косарев А.В. О механизме окислительного фосфорилирования. III. Зависимость функциональных показателей от состава среды инкубации митохондрий // Биофизика. 1977. Т. 22, вып. 4. С. 751-755.
6. Шпаков А.А., Панченко Л.Ф. Ферментная, электронномикроскопическая и полярографическая характеристики изолированных митохондрий мозга крыс. II. Влияние состава среды выделения // Цитология. 1974. Т. 16, вып. 9. С. 1124-1129.

DILUTION OF THE INCUBATION MEDIUM BY THE OXYGEN-FREE ADDITIVE AS THE PROBABLE CAUSE OF THE EFFECT OF FAST CONSUMPTION OF THE OXYGEN

M.B. Belyakova, M.V. Minyaev, A.A. Egorova, L.I. Voronchikhina

Tver State University

The phenomenon of the effect of fast consumption of the oxygen, consisting in fast decrease in indications of polarograph under the addition to the incubation medium of mitochondrial preparations, even in the absence of oxidation substrates, has been modeled. It has been shown, that the most probable cause of such an effect is a dilution of the incubation medium by the preparation with the oxygen content significantly lower, than in the medium.